

RESUMO

Entamoeba histolytica é um protozoário parasito que representa risco para a saúde de milhões de indivíduos. Em virtude da existência de diversas formas clínicas da doença e de cepas com virulências distintas, é de se esperar que ocorram variações no perfil de transcritos gênicos entre cepas atenuadas e virulentas. Neste trabalho, a técnica de apresentação diferencial de RNAs (DDRT-PCR) foi utilizada com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos entre cepas atenuadas, HM1 e CSP e reisoladas (virulenta), HM1R e CSPR de *E. histolytica*. Para alcançar esse objetivo, RNAs das cepas atenuadas e reisoladas foram extraídos, o cDNA foi preparado e submetido a reações de PCR utilizando iniciadores aleatórios em condições de baixa estringência. Inicialmente, 29 fragmentos foram identificados como específicos das cepas reisoladas, sendo que 14 foram clonados e seqüenciados. Estas seqüências foram submetidas à pesquisa de homologia em bancos de dados, totalizando 12 genes a serem testados. O caráter de expressão diferencial foi avaliado pelas técnicas de RT-PCR semiquantitativa e por PCR em tempo real para 11 dos genes encontrados. Houve a confirmação da expressão diferencial de todos, sendo 10 mais expressos pelas cepas reisoladas e um pelas cepas atenuadas. Os genes confirmados, por RT-PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa, como mais expressos nas cepas reisoladas de *E. histolytica* foram os que codificam proteínas hipotéticas, fosfatase ácida, fator de troca de nucleotídeo Ras guanina, enzima envolvida no transporte de cálcio e proteína similar à cdc48. Além disso, também foi avaliada, entre as cepas atenuadas e reisoladas a expressão dos genes da acetiltransferase, triptofanil tRNA sintetase, proteína

diaphaunos e cisteil proteinase 1, considerados mais expressos em trofozoítos provenientes de lesão em fígado de hamster quando comparados aos de cultura. Destes, os três primeiros foram mais expressos nas cepas reisoladas, demonstrando que o perfil de transcrição, ao menos para alguns genes, nas cepas reisoladas reflete ao encontrado nos trofozoítos presentes em abscesso hepático em modelo experimental.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoan parasite that represents a health risk to millions of individuals around the world. Infected people can present diverse forms of clinical disease. It has already been demonstrated, that this fact correlates to differences in the virulence of different strains. Therefore, it is expected that the genetic expression profile, should be, at least in part, specific to attenuated and virulent strains. In this work, the technique of differential display of RNAs (DDRT-PCR) was used to identify differentially expressed genes between attenuated strains HM1 and CSP, and between virulent strains, HM1R and CSPR of *E. histolytica*. Therefore, RNAs of the attenuated and virulent strains were extracted, the cDNA was prepared and submitted to PCR reactions using arbitrary primers. Initially, 29 fragments were identified as virulent strains specific,, 14 were cloned and sequenced. These sequences were submitted to homology search in gene databases, and 12 presenting homology either to hypothetical or known genes, were selected to be tested. The character of differential expression was evaluated by the techniques of semiquantitative RT-PCR and real-time PCR for 11 of the identified genes. There was the confirmation of differential expression to all genes analyzed, 10 more expressed by virulent strains and one more expressed by an attenuated strain. From the confirmed differentially expressed genes, five coded to hypothetical *E. histolytica* proteins. Other ESTS confirmed as more expressed to virulent strains, presented homology to *E. histolytic* genes: acid phosphatase,; factor of Ras guanine nucleotide exchange; enzyme involved in the transport of

calcium; and a protein similar to cdc48. Moreover, the expression of genes identified in a previous work as been more expressed in trophozoites originated from hamster injured liver when compared to trophozoites from culture, was also analyzed in virulent versus attenuated strains. The genes evaluated, were, acetyltransferase, triptofanil tRNA synthetase, protein diaphaunos and cisteil proteinase 1. It was shown that the first three genes were more expressed in virulent strains, demonstrating that the transcription profile, at least for some genes, in virulent strains reflects the same results found to trophozoites from liver abscess, in an experimental model.